

131

Prof. MARIO FORMISANO

RICERCHE SUL " CALORE ROSSO " DELLE PELLI SALATE

*Nota introduttiva ad un gruppo di ricerche eseguite con il contributo
del Dipartimento di Agricoltura U. S. A. (Legge Pubblica 480).*

Estratto dal « Bollettino della Stazione Sperimentale
per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti »

Vol. XXXVIII - Febbraio 1962 N. 1

TIPOGRAFIA A. TRANI - NAPOLI

Premessa

Il problema riguardante la causa primaria e le cause concorrenti alla alterazione nota col nome di « calore rosso » delle pelli salate ha, senza dubbio, un elevato valore scientifico e pratico: basti infatti pensare che da un punto di vista scientifico esso investe un insieme di fatti, biologici, istologici, chimico-fisici, su cui ancor oggi scarse sono le conoscenze e, da un punto di vista pratico il problema è estremamente interessante in quanto in tutto il mondo il commercio delle pelli tocca gli interessi di innumerevoli categorie, a cominciare dagli allevatori di bestiame e poi ai produttori di pelli grezze, ai conciatori e fino alle industrie manifatturiere, ecc. e che, ogni anno, i danni microbiologici e chimico-fisici sulle materie prime e sui manufatti assommano a diversi milioni di dollari.

Benchè, però, l'interesse scientifico-tecnico sia elevato, ancor oggi, il problema della conoscenza delle alterazioni formanti oggetto di considerazione nella presente nota, è lungi dall'essere definitivamente risolto.

Molti fattori sono stati finora presi in esame (di natura fisica, chimica, biologica) e, per quel che concerne in particolare gli agenti microbici, diversi germi sono stati isolati e studiati più o meno approfonditamente, così come diversi sono stati i mezzi e i metodi patrocinati dai ricercatori per ovviare agli inconvenienti, ma senza apprezzabili risultati positivi.

L'occasione di indagare sull'argomento ci viene offerta da due fatti concomitanti; il primo legato all'esistenza, qui a Napoli, dell'unica Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti, di tutta Italia; il secondo si basa su di un contributo posto a disposizione dall'U.S. Department of Agriculture di Washington, per il quale il problema dell'accertamento delle cause di alterazione delle pelli assume una notevolissima importanza.

Noi, perciò, con la presente nota, intendiamo dare inizio ad una serie di indagini microbiologiche, chimico-fisiche, istologiche, ecc. intese ad isolare e caratterizzare, prima, l'agente o gli agenti causa dell'alterazione, per poi accertare in qual modo questi agenti attaccano i componenti della pelle ed

in quali condizioni prosperano o restano latenti nel tessuto dermico, per passare infine a studiare quali prodotti chimici, antibiotici o di altra natura possano essere incorporati nel processo di conservazione delle pelli, allo scopo di prevenire o impedire lo sviluppo, sulle pelli stesse, del « calore rosso », durante il magazzinaggio e la spedizione attraverso gli oceani ed i continenti.

Se riusciremo — come speriamo — a chiarire taluni aspetti del vasto problema e ad indicare qualche mezzo per ridurre o eliminare l'alterazione, potremo ritenere di aver compiuto una pur modesta opera meritoria.

In questo primo contributo passeremo intanto in rassegna le indagini già compiute dai precedenti ricercatori, ma indicheremo, nel contempo, anche i mezzi e le metodiche di base che ci serviranno per l'ulteriore svolgimento del nostro lavoro, nonché i primi risultati scientifici che verremo ad acquisire.

Alcuni dati sulla struttura e sulla composizione chimica delle pelli.

E' noto che la parte connettivale, cioè il corion, è la porzione più importante della pelle, in quanto essa è responsabile della maggior parte delle caratteristiche del cuoio finito.

Questo corion è composto da fasci fibrosi di collagene che trattengono, nei loro interspazi, le fibre reticolari del tessuto, i fibroblasti, i vasi sanguigni ed il tessuto nervoso.

Le fibre collageniche, di lunghezza variabile, sono a loro volta costituite da fibrille elementari che hanno in genere un diametro di circa 3 micron. Posseggono, inoltre, fra l'altro, una notevole flessibilità ed offrono una grande resistenza alla trazione [Mao e Roddy (88)], sono elastiche e cedevoli, anche se, in particolare la elasticità non deve essere intesa nel senso comune della parola [Grassmann (50)].

I costituenti principali della pelle sono: a) di natura proteica; b) di natura lipidica; c) di natura glucidica; inoltre sono presenti sali minerali.

Le proteine sono rappresentate, per la massima parte, da collagene che costituisce circa il 30% della proteina totale del corpo del mammifero e possiede circa il 99,8% dell'azoto totale. Il collagene è legato a glicoproteine e mucopolisaccaridi, spesso in maniera così tenace, che riesce difficile ottenerlo allo stato di assoluta purezza. Secondo Bowes e Kenten (16), le caratteristiche chimiche del collagene, oggi generalmente accettate, si fondano su questi fatti fondamentali: Il collagene ha una caratteristica composizione in amminoacidi (fra i quali, in maniera cospicua, sono presenti la glicina, la prolina e l'idrossiprolina; in misura scarsissima invece sono tutti gli amminoacidi aromatici): possiede inoltre dei carboidrati [Grassmann e Schleich (51) hanno caratterizzato il glucosio ed il galattosio nel rapporto di 1:1;

Schneider (115) ha isolato una frazione contenente glucosio, galattosio e glucosammina; Gross e coll. (52) hanno trovato, sebbene in piccola quantità, il mannosio]; è accompagnato, inoltre, da mucoïdi o mucoproteine (unione chimicamente stabile di amminozuccheri e peptidi o proteine); di glicoproteine (un complesso di carboidrati polimeri, caratterizzati dal loro contenuto in amminozuccheri e comprendenti acido ialuronico e solfato di condroitina, entrambi di natura acida).

La parte lipidica è rappresentata da lipidi propriamente detti (trigliceridi, cere, ceridi, fosfolipidi) nonchè da steroli (il colesterolo esiste infatti nel tessuto vivente sia come colesterolo libero, sia come colesterolo esterificato e combinato con acido grasso).

La parte glucidica è egualmente complessa nella pelle in quanto, in particolare, essa non si limita agli zuccheri derivati da un'unica sostanza monomera, ma anche da polisaccaridi (in particolare glicogeno), nonchè da amminozuccheri (glucosammina e galattosammina).

I sali minerali, infine, sicuramente accertati [Leutsker (80), Mc Laughlin e Theis (90), ecc.] sono costituiti per la massima parte da fosforo e potassio, quindi, in ordine decrescente, da sodio, calcio, magnesio, arsenico, zinco, ferro, silicio e rame, la cui origine e la cui funzione fisiologica sono quanto mai interessanti.

Ed ora, al fine di dare una visione d'insieme sulla composizione chimica della pelle bovina, riportiamo nelle tabelle che seguono alcuni dati fondamentali, raccolti dalla letteratura scientifica già nota sull'argomento, nonchè da noi stessi ricercati ed elaborati.

Appare evidente dai dati riportati in tab. n. 1 che la pelle fresca bovina ha un elevato contenuto in acqua ed in sostanza dermica: la prima oscilla, in genere, tra il 60 ed il 70% ed è necessario conoscerne la percentuale per potere stabilire se le pelli sono pregne d'acqua o sono naturalmente idratate, ovvero sono state salate (in quest'ultimo caso, che ha considerevole importanza pratica, il contenuto in acqua si abbassa di circa il 30%); la seconda, cioè la sostanza dermica, si aggira intorno al 25-30% del totale ed interessa direttamente il conciatore in quanto permette di calcolare il rendimento medio del materiale in esame. L'azoto solubile dà la misura delle proteine solubili (sangue, linfa) e dei prodotti d'idrolisi che si formano quando le pelli si trovano in uno stato fermentativo. La quantità di pelo, inoltre, che la pelle contiene è un indice del suo valore e consente anche di distinguere, oltre al sesso ed allo stato di salute dell'animale, le pelli d'estate da quelle d'inverno.

In base alla composizione chimica delle pelli fresche bovine [i dati riportati nella tab. n. 1 sono stati ricavati da una serie di analisi effettuate da E. Simoncini (122)] si evidenzia chiaramente che le pelli stesse costituiscono un substrato naturale suscettibile di profonde modificazioni chimico-fisiche

TABELLA N. 1

Costituenti	Composizione media della pelle bovina fresca				Media totale		Composizione media della pelle bovina salata (25% di NaCl)				Media totale					
	Groppone		Collo con testa		A	B	Groppone	Collo con testa	Fianchi	I	II	I	II			
	A	B	A	B												
Acqua	62,63	63,99	65,74	66,85	66,90	65,53	64,89	65,28	46,27	43,79	46,76	44,80	49,78	45,57	47,56	44,66
Sale	—	—	—	—	—	—	—	—	13,21	13,77	12,87	13,59	13,86	15,84	13,35	14,44
Sostanza dermica	31,63	29,10	27,10	26,97	23,79	24,48	27,73	26,94	33,24	33,53	28,62	29,32	24,39	24,67	28,98	29,37
Azoto solubile	0,34	0,36	0,56	0,49	0,52	0,53	0,46	0,51	0,55	0,57	0,67	0,70	0,62	0,75	0,60	0,66
Pelo	1,99	2,13	1,53	1,71	4,40	3,97	2,69	2,78	1,98	2,01	1,87	2,01	3,79	3,87	2,57	2,59
Grassi	0,62	0,65	0,68	0,76	0,85	1,03	0,71	0,81	0,58	0,59	0,75	0,77	0,93	0,96	0,72	0,77
Ceneri	0,36	0,47	0,37	0,38	0,33	0,61	0,35	0,50	0,46	0,46	0,44	0,44	0,52	0,48	0,48	0,46
Sostanze indeterminate	2,43	3,30	4,02	2,84	3,21	1,85	3,07	3,18	3,71	5,28	8,02	8,37	6,11	7,86	5,74	7,05

Nota: A = animale giovane che non ha ancora partorito;

B = animale adulto che ha partorito più d'una volta;

I = analisi dopo 20 giorni dalla salatura;

II = analisi dopo 3 mesi dalla salatura.

sotto l'influenza dei fattori dell'ambiente e di alterazioni biologiche causate da microrganismi, come indicheremo alquanto estesamente in seguito.

Nella tabella n. 2 vengono riuniti, invece, i dati concernenti il contenuto medio in sostanze lipidiche, particolarmente nell'epidermide e nel corion della pelle bovina, secondo quanto ha stabilito Koppenhoefer (77).

TABELLA N. 2

Costituenti in % dell'estratto secco	Contenuto medio in lipidi della pelle bovina	
	Epidermide	Corion
Lipidi estraibili totali	8,55	1,06 — 11,9
Fosfolipidi totali	1,84	0,134 .
Lecitina	1,16	0,041
Cefalina	0,27	0,003
Sfingomielina	0,13	0,044
Colesterolo totale	1,20	0,072
» esterificato	0,45	0,00
» libero	0,75	0,072
Cere	2,98	0,48 — 11,0
Acidi grassi liberi	0,74	0,030
N. di jodio sui lipidi totali	58,8	60,4

I lipidi, in genere, sono maggiormente concentrati intorno alle ghiandole sebacee, lungo il canale del pelo e nelle cellule nucleate dello strato della epidermide. Un'alta concentrazione, sebbene irregolare, si ha pure nel corion. Secondo Koppenhoefer (77) il colesterolo rappresenta circa il 15% dei lipidi totali della porzione epidermica; i fosfolipidi il 20%; gli acidi grassi il 10% e le cere il 35%. Del colesterolo totale, circa un terzo è presente sotto forma esterificata, mentre per i fosfolipidi un 60% è costituito da lecitina, un 15% da cefalina ed un 70% da sfingomielina, ed il rimanente, da derivati acidi fosfatici.

Nel corion il contenuto lipidico totale si aggira intorno all'1% del peso secco del corion medesimo, ma può raggiungere anche l'11% o addirittura il 30% nel caso di deposizione abbondante delle riserve di grasso in animali ben nutriti.

Ed ancora, il rapporto medio tra acidi grassi liquidi e solidi è di circa 2 : 1. I primi, cioè i lipidi, sono principalmente rappresentati da acido oleico e in misura scarsissima da acido linoleico. Gli acidi solidi sono miscugli pressochè uniformi di acido palmitico e stearico.

Per quanto concerne invece la composizione in amminoacidi dei costituenti proteici del collagene della pelle bovina, riportiamo nella tabella che segue i dati riassuntivi, in base alla moderna letteratura specifica.

TABELLA N. 3

Costituenti in % della proteina totale	Contenuto medio in amminoacidi della pelle bovina		A u t o r i
	Collagene di pelle (*)	Gelatina (**)	
Azoto totale	18,60	18,14	
Azoto ammidico	0,66	0,11	(*) : Bowes e Kenten (16)
Glicina	26,2	27,5	
Alanina	9,5	11,0	(**): Eastoe (28)
Leucina	} 5,6	3,33	
Isoleucina		1,72	
Valina	3,4	2,59	
Serina	3,4	4,21	
Treonina	2,4	2,22	
Metionina	0,8	0,78	
Cistina	—	4,50	
Prolina	15,1	0,97	
Idrossiprolina	14,0	0,89	
Fenilalanina	4,2	—	
Tirosina	1,4	16,35	
Triptofano	—	14,1	
Arginina	8,8	2,23	
Istidina	0,8	0,29	
Lisina	4,5	—	
Idrossilisina	1,3	8,8	
Acido aspartico	6,3	6,7	
Acido glutammico	11,3	11,4	

Dai dati testè riportati appare evidente che la composizione in amminoacidi della gelatina è molto simile a quella del collagene da cui la gelatina stessa ha avuto origine. Una certa differenza esiste solo in rapporto ai mezzi impiegati (processo alcalino o processo acido) per l'estrazione della gelatina dal collagene.

Ma la pelle bovina contiene piccole quantità di proteine solubili, sulle quali scarsissime sono le conoscenze a tutt'oggi. A parte la solubilità rispetto alle proteine fibrose (reticolina, elastina, elastina solubilizzata) esse sono anche molto più sensibili alle influenze dannose dell'ambiente; vanno soggette infatti, spesso, al fenomeno detto di « denaturazione »; si originano in genere o dal plasma sanguigno mediante transudazione, ovvero vengono elaborate dalle cellule del tessuto connettivale ed infine, per la maggior parte, sono costituite dalla cosiddetta « sostanza basale », sostanza ancor oggi chimicamente ed istologicamente poco definita (è stata talora descritta come un liquido, ovvero come un mezzo simile al gel, a struttura membranosa, o ancora possedente azione cementante per le fibre collageniche, o infine avente azione lubrificante), ma comunque ritenuta un complesso di proteine e mucopolisaccaridi.

I costituenti minerali della pelle, come dicevamo in precedenza, esplicano funzioni fisiologiche assai interessanti.

La maggior parte del fosforo, ad esempio, è presente nello strato epidermico e senza dubbio trae origine dall'alto contenuto in fosfolipidi di questo strato. Il ferro si origina dall'emoglobina del sangue e dal nucleo e dalla cromatina delle cellule, ma anche dal pelo. Il rame è in relazione ai pigmenti che si trovano nella pelle, così il calcio ed il magnesio si rinvengono, in una certa concentrazione, negli strati basali del sistema epidermico ove, in particolare, il calcio sembra dare una maggiore stabilità ed adesività alla superficie delle cellule.

Il contenuto medio in sali minerali della pelle bovina appare riassunto nella tabella che segue (tab. n. 4).

Nella tabella n. 5 indichiamo invece la composizione chimica delle pelli Packers americane che costituiscono la materia prima sottoposta alle indagini di natura microbiologica, attualmente in svolgimento (45).

Le analisi chimiche sono state eseguite presso il Laboratorio chimico della Stazione Sperimentale per l'industria delle pelli e delle materie concianti di Napoli.

TABELLA N. 4

Costituenti in mg%	Contenuto medio in sali minerali della pelle bovina (1)	Contenuto medio in sali minerali del corton fresco di pelle di : (2)					Autori
		Manzo	Vacca	Vitello	Toro	Giovenca	
Fosforo (P_2O_5)	351	31,8	26,2	82,9	33,4	18,1	(1) Leutsker (80) (2) Mc Laughlin e Theis (90)
Potassio	322 — 558	—	—	—	—	—	
Sodio (NaCl)	122 — 247	445	353	443	482,5	441	
Calcio (CaO)	15 — 65	10,1	3,8	9,5	12,4	3,8	
Magnesio (MgO)	18 — 34	3,2	3,0	7,3	3,9	3,4	
Arsenico	26	—	—	—	—	—	
Zinco	2,4	—	—	—	—	—	
Ferro (FeO_3)	1,0	10,7	19	13,4	12,4	19,4	
Alluminio (Al_2O_3)	—	—	—	—	—	—	
Silicio (SiO_2)	0,15 — 1,50	—	3,7	4,8	—	—	
Cloro (Cl)	—	273	213	269	293	267	
Rame	0,56	—	—	—	—	—	
Solfo (SO_3)	—	70,2	61,4	95,2	68,9	68,5	
Rapporto MgO/CaO	—	1:3,20	1:1,00	1:1,30	1:3,20	1:1,10	
Rapporto P_2O_5 /Cao	—	1:0,32	1:0,14	1:0,11	1:0,37	1:0,18	

TABELLA N. 5

Costituenti %	Pelli Packers salate
Umidità	34,78
Cloruro sodico	16,83
Sostanze grasse	11,83
Sostanza dermica	29,13
Azoto solubile	1,21
Sostanze non determinate (pelo, sterco, ecc.)	4,12
Ceneri	2,10
pH lavabile (20‰)	6,80

Stato attuale delle nostre conoscenze sul « calore rosso » delle pelli salate.

Le prime constatazioni che sulle pelli salate si manifestavano macchie rosse che le deprezzavano come materia prima nell'industria di numerosi manufatti, sono antiche al pari dei mezzi di conservazione delle pelli stesse.

Le macchie si presentano sul lato carne e particolarmente sulla parte esposta all'aria e possono essere a strisce, a grandi pustole isolate o confluenti, di colore rosso-vivo fino a marrone (specie se la pelle va asciugandosi), umidicce, limose, rilevate; possono infine manifestarsi su una ristretta zona ovvero estendersi a tutta la superficie della pelle.

Apparentemente sembra interessino soltanto lo strato superficiale della pelle (lato carne), per lo meno ad un esame macroscopico, tanto da poter essere rimosse con facilità meccanicamente. Non può escludersi, però, che esse portino ad una vera distruzione delle fibre collageniche e ad una perdita di sostanza dermica.

Ma i lavori scientifici che trattano dell'argomento, sebbene siano numerosi per quanto riguarda le alterazioni similari sui pesci salati, a cominciare dal primo esame effettuato nel 1878 da Farlow (34, 35) su merluzzo arrossato, fino ai recentissimi di Dinah e Gibbons (24) del 1960 o di Payne e coll. (95), pure del 1960, non altrettanto può dirsi per le pelli, sicchè ancor oggi non è stata definitivamente accertata la causa dell'alterazione, nè è stato trovato

un mezzo idoneo che possa impedire il manifestarsi dell'alterazione medesima o che possa limitarne lo estendersi e quindi il danno, qualora sia già comparsa.

Noi non passeremo in rassegna tutti i lavori fin qui sufficientemente noti, limitandoci a considerarne alcuni che, riteniamo, abbiano maggiore interesse; li indicheremo, però per quanto possibile e per quel che ci consta, estesamente in bibliografia.

Per quanto concerne le conoscenze fino ad un trentennio addietro, a cominciare dalle prime osservazioni tecniche dei produttori di pelli sudamericane, contenute in una lettera inviata al Presidente della « Camara de Sub-Productos Ganadero de la Bolsa de Comercio in Buenos Ayres », nonché dalle prime ricerche scientifiche di Becker (9), del 1912 e poi di Lefreve e Round (79) del 1919; di Harrison e Kennedy (57) del 1922; di Bergmann (11) del 1929; di Lloyd e coll. (85) del 1929; di Stather e Liebscher (131, 132) del 1929-30; di Robertson (103, 104) del 1931-32; di Blankow (12) del 1933; di Stuart, Frey e James (135) del 1933; ecc.; molto si può attingere dai lavori di grande interesse di Stuart e coll. (135) del 1933 e di Lochhead (83) del 1934.

Da tutti questi studi si deduce che diverse sono le opinioni per quanto concerne la vera causa dell'arrossamento delle pelli e per gli effetti negativi sia sulla qualità che sulla quantità del cuoio risultante. Molti Autori sono di accordo nel ritenere che l'alterazione detta di « calore rosso » sia di origine microbica e che gli organismi che la causano derivano dai sali (in particolare quelli marini) adoperati per la conservazione delle pelli; altri, però, sostengono che gli organismi responsabili dell'arrossamento si trovano normalmente sulle pelli scuoiate di fresco.

Su alcuni fattori, però, influenzanti lo sviluppo dell'arrossamento, sono d'accordo tutti i ricercatori e cioè, sono da considerare fattori predisponenti e specifici alla comparsa ed allo intensificarsi del danno:

1) la reazione del mezzo (solo reazioni alcaline: $\text{pH} = 7,0 - 8,0$ e talora fino a $\text{pH} = 11,0$ accentuano l'arrossamento e fanno prosperare abbondantemente i germi specifici);

2) la temperatura (anche se l'optimum è rappresentato da $37,5^\circ$, temperature da 20° a 55°C . sono egualmente idonee e le colorazioni relative sono tipicamente rosse fino a rosso-mattone intorno ai 37°C .; al disotto della predetta temperatura le colorazioni vanno dal rosa al rosa-corallo; a temperature elevate le colorazioni sono cremisi-chiare);

3) l'umidità relativa (solo al disopra del 60%, l'arrossamento è generalizzato ed intensificato);

4) la concentrazione del sale (concentrazioni anche fino al 30% non impediscono la comparsa delle macchie rosse).

Abbiamo introdotto il concetto che ai germi alofili sia da attribuire il danno sulle pelli salate, dal momento che la letteratura scientifica al riguardo segnala appunto l'esistenza, in natura, di microrganismi particolari alotolleranti ed alofili obbligati.

Sono questi, infatti, microrganismi epifitici naturali del sale, delle salamoie, dell'acqua di mare. Mentre però gli alotolleranti sopportano concentrazioni in NaCl non eccessive (fino a 10-12% di cloruro sodico), gli alofili obbligati richiedono invece una concentrazione non inferiore al 10% di NaCl e sono capaci di svilupparsi facilmente fino a saturazione (30-33% di NaCl).

Le prime constatazioni dell'esistenza di questi particolari microrganismi si perdono nella notte dei tempi, anche se, ben s'intende, non si può attribuire alla espressione microrganismo il significato che oggi comunemente si dà.

Sembra addirittura, come riferisce Baas-Becking (3), che l'arrossamento del sale marino fosse noto ai cinesi sin dal 2700 a. C. Comunque è certo che presso gli egizi ed i romani si parlava di sale arrossato o scarlatto. Si riteneva, però, che il sale colorato fosse soltanto il risultato di una reazione chimica, e solo molto più tardi si scoprì che la causa poteva essere anche legata ad attività microbiche.

Molti microrganismi furono allora isolati dal sale di diversa provenienza ed oggi possiamo dire che in genere gli autori sono d'accordo nel ritenere che essi siano più abbondanti, per numero e per specie, nel salmarino anziché nel salgemma. Sono infatti noti gli studi di Elazari-Volcani (31), di Frederick (46), di Kellermann e Smith (75), di Smith (123), di ZoBell e coll. (147), di Baranik-Pikowsky (4), di Rubentschik (111, 112), di Saslawsky (113, 114), di Harrison e Kennedy (57), di Zo Bell (146), ecc., e le descrizioni dei germi da essi isolati dal Mar Morto, dal Gran Lago Salato, dai mari di Liman e di Odessa, dagli oceani.

L'interesse pratico, però, per gli alofili cromogeni è andato sempre più estendendosi quando due grandi industrie: quella della pesca e quella della concia delle pelli, hanno assunto un ruolo importante nell'economia dei popoli.

Per quanto riguarda l'arrossamento dei pesci, il cui danno è senza dubbio elevato, molti germi sono stati isolati e descritti e sono stati consigliati diversi mezzi per ovviare all'inconveniente, e con risultati spesso apprezzabilmente positivi (21, 22, 25, 35, 56, 58, 59, 60, 64, 81, 101, 121).

Per quanto concerne l'arrossamento delle pelli il danno è ancor più accentuato se si pensa che mentre il pesce viene sempre utilizzato subito dopo essere stato raccolto (sia allo stato fresco per il consumo immediato, sia allo stato conservato, congelato o salato, ma sempre trattato appena raccolto),

le pelli invece, non dovendo servire all'alimentazione, ma solo nell'industria dei manufatti, se non vengono trattate appena rimosse dagli animali, possono andare completamente distrutte in seguito ai processi fermentativi (putrefazione in particolare) che si manifestano o alle azioni chimico-fisiche che vi si impiantano.

Sicchè oggi è pratica comune far perdere alle pelli parte del loro contenuto in acqua (e che costituisce, come abbiamo indicato nelle tabelle precedenti riguardanti la composizione chimica delle pelli stesse, più della metà, in peso, dei suoi costituenti), mediante salatura (101), la quale rappresenta il mezzo più economico ed efficace e, pertanto allo stato attuale, insopprimibile ed insostituibile, per consentirne la conservazione.

Ed è appunto in seguito alla salatura che le pelli spesso si arrossano (« arrossamento », « riscaldamento », « arrossamento frigorifico », « calore rosso » sono le denominazioni più largamente usate per indicare e classificare l'alterazione).

Ma i germi alofili non interessano soltanto, come dicevamo in principio, l'industria della pesca e quella conciaria. Anche l'industria petrolifera trova spesso ostacolo alla risoluzione dei suoi problemi, allorchando deve impiegare l'acqua salata per i suoi pozzi, per cui oggi questo sistema sta per essere quasi ovunque completamente abbandonato. Così sono interessate alla soluzione del problema talune industrie alimentari, prime fra le altre, quelle che trattano e conservano olive, cocomeri, cavoli, acciughe, prosciutto, formaggi, carne in scatole ed altri cibi, come hanno posto nel massimo rilievo gli studi di Baumgartner (5), di Foda e Vaugh (40), di Hankins e coll. (54), di Lefreve e Round (79), di Schoop (117), di Smith (124), di West e coll. (143), ecc.

In definitiva possiamo dire che tutte le industrie che trattano i loro prodotti col sale hanno interesse a vedere risolto il problema della conoscenza dei germi specifici, delle alterazioni e trasformazioni cui essi possono dar luogo, dei mezzi idonei a ridurre o impedire il danno.

Recenti acquisizioni sulle esigenze ambientali e sui caratteri dei germi alofili ed alotolleranti.

I fattori che influenzano la crescita ed il metabolismo dei microrganismi alofili sono numerosi e complessi e molti di essi ancor oggi non sono stati considerati mentre, per quelli finora presi in esame, scarse, frammentarie e talvolta addirittura controverse sono le vedute dei singoli ricercatori.

Il sale, e per esso la sua concentrazione, rappresenta uno dei principali fattori su cui si è condotto il maggior numero di indagini.

Ma quale sia l'influenza esercitata dal sale sui germi alofili non è conosciuta appieno; non si sa, ad esempio, se essa possa ritenersi dovuta alla molecola indissociata del NaCl, ovvero, all'anione o al catione, o ancora a tutti e tre insieme; nè, d'altra parte, si sa se questa influenza dipende o non dalla composizione del mezzo per le interferenze che possono manifestare, fra l'altro, le proteine del mezzo stesso, il pH, la presenza di altri sali. E' noto infatti che i germi hanno una facilità di adattamento all'ambiente e quindi anche alle eventuali condizioni anormali di questo.

Sono state, ben vero, studiate le interrelazioni anioni-cationi (anche di sostanze di diversa valenza), ma se vi sia antagonismo e se questo sia soltanto qualitativo oppure quali-quantitativo sulla crescita degli alofili, non è ancora noto.

Si dovrebbe, ad esempio, stabilire se anche nei germi alofili vi sia una inattivazione di alcune proteine (apoenzimi) dal momento che McLeod e Snell (87) hanno, per l'appunto, trovato questa inattivazione da parte dello zinco su germi non-alofili, durante la formazione di metallenzimi.

Quali siano poi gli effetti della tossicità ionica sulla permeabilità della membrana cellulare in seguito alla sostituzione del NaCl per gli alofili con altri sali a differenti concentrazioni, aventi la stessa influenza (in particolare la stessa isotonia) del cloruro di sodio, ed ancora quali siano gli effetti fisici degli ioni sul metabolismo e la fisiologia dei germi alofili, quali i fattori di disidratazione, quali le interferenze con l'azione rapida degli enzimi proteolitici, quale l'effetto diretto dell'ione-cloro o dell'ione-sodio sui germi stessi, sono fatti non completamente noti.

Molte sono state le ricerche al riguardo [Rockwell e Ebertz (110), Robinson (105), Robinson e coll. (107 - 109), Ingram (68), Flannery (36 - 37), Yamada e Shio (145), Baxter e Gibbons (7, 8), Robinson e Katznelson (109), Yamada e Asano (144), Egami e coll. (30), Tsuyuki e MacLeod (139), Richter (102), Flannery e coll. (39), ecc.], ma i risultati sono stati spesso contraddittori. Per essi rimandiamo all'interessante nota critica di Flannery (37), del 1956.

I germi alofili poi, a differenza degli altri microrganismi, oltre ad avere particolari esigenze nutritive, richiedono anche mezzi e trattamenti specifici per potere essere messi in evidenza.

Basti pensare, ad esempio, come hanno dimostrato Katznelson e Robinson (73) operando con sospensioni attive di cellule e con estratti esenti da cellule di alcuni ceppi di *Pseudomonas salinaria*, *Pseudomonas cutirubra*, *Sarcina litoralis* e con un ceppo speciale di *Sarcina*, che un ruolo importante sulla attività respiratoria viene esercitato dalle sostanze chimiche presenti nel mezzo di coltura. Così questi ceppi si procurano il carbonio e l'energia necessaria al loro metabolismo, dall'ossidazione degli amino acidi.

La morfologia dei germi alofili, in genere sembra sia influenzata dalla diversa concentrazione di sale. Spruit e Pijper (127), Flannery (36-38), Stuart (133, 134), Lochhead (83, 84) ed altri ritengono che facendo variare la concentrazione salina, le forme batteriche allungate presentano un polimorfismo talora accentuato in quanto compaiono forme a spatole, forme appiattite e perfino forme tondeggianti.

Noi pensiamo, però, in seguito ai risultati ottenuti studiando i germi in parola come causa del « calore rosso » delle pelli (45), che un vero e proprio polimorfismo questi germi non lo presentano; tutto al più le poche variazioni di forma siano piuttosto un pleomorfismo legato il più delle volte all'influenza delle tecniche di colorazione impiegate.

A tal riguardo, come più estesamente verrà detto nella nostra nota successiva (45), abbiamo ovviato, in gran parte all'inconveniente, introducendo la tecnica che chiamiamo di « colorazione-scolorazione », mercè la quale le forme in istudio (e sono numerose: ben 236 ceppi di alofili cromogeni o jalini) hanno sempre presentato una forma tipica e stabile su uno stesso substrato nutritivo.

Anche per quanto concerne la presunta variabilità morfologica degli alofili in seguito ai ripetuti trapianti su substrati artificiali [Smithies e coll. (126), Smithies e Gibbons (125), ecc.] noi pensiamo che non possa essere accettata considerando che abbiamo eseguito finora più di 50 trapianti periodici successivi dei nostri ceppi sullo stesso substrato a composizione standard senza che siano comparse forme a morfologia marcatamente differente.

Siamo invece d'accordo con gli altri studiosi sul problema della intensificazione od attenuazione del colore degli alofili cromogeni in seguito alla loro ripetuta coltivazione su substrati di laboratorio, specie poi se ci si allontana dalle condizioni ottimali (temperatura, umidità, concentrazione e tipo di sale, pH, ecc.).

Circa la natura del pigmento (in particolare quello rosso) degli alofili cromogeni, Petter (96), che ne ha più estesamente studiato le proprietà fisiche e chimiche, ritiene che debba riconoscersi il tipo carotenoide (batterioruberina α e β), anche se da taluno è stato suggerito che potrebbe esservi una rodoviolascina dimetilata.

Noi abbiamo potuto osservare un fatto caratteristico (45) e cioè, allorché veniva saggiata la solubilità del pigmento con diversi solventi organici, in particolare con l'etere (in misura più accentuata) ma anche con lo alcool etilico e l'alcool metilico il pigmento in essi solubile dopo un contatto di 12-24 ore si trasformava in leucoprodotto.

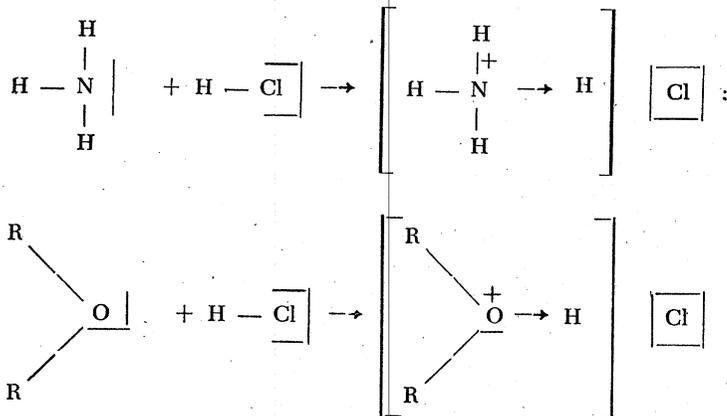
Nel valutare le cause determinanti tali modificazioni si prese in considerazione quella relativa alla capacità del legame etero di dar luogo alla

formazione di composti di addizione con gli alogenuri metallici (nel nostro caso con NaCl), acidi alogenidrici ed altri (*).

La sottrazione, infatti dal mezzo, del NaCl che si lega nel composto

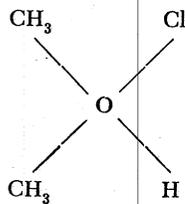
(*) I composti di addizione che si formano tra gli eteri, gli acidi alogenidrici ed altri acidi ed alogenuri metallici sono assai interessanti.

La formazione di questi composti si può schematizzare con la seguente formula elettronica :

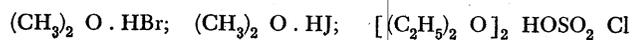


Friedel descrisse il primo composto di questo tipo, e cioè il composto di addizione dell'etere dimetilico con l'acido cloridrico:

$(\text{CH}_3)_2 \text{O} \cdot \text{HCl}$, considerato come un derivato dell'ossigeno tetravalente, di questo tipo :



Poi Mc Intosh ne preparò altri :



di addizione formando un sale di ossonio (71) con l'etere, farebbe cessare la disponibilità per le cellule del NaCl (da cui la relativa decolorazione) mediante un probabile meccanismo competitivo che si svolgerebbe per la maggiore affinità del NaCl verso l'addizione a legame etero rispetto a quella tra gruppo proteico cellulare (ovvero pigmento) e NaCl.

Da ciò si dovrebbe dedurre la necessità, per la formazione dei pigmenti, della presenza di NaCl, in mancanza del quale si dovrebbe assistere ad uno sviluppo apigmentato.

A confermare ciò riteniamo si renda necessario sostituire in coltura altra sostanza, in tale concentrazione, da essere isotonica rispetto alla concentrazione del 27,5% di NaCl che noi di regola stiamo adoperando e che è da ritenersi ottima per lo sviluppo dei nostri ceppi in studio (45).

I risultati di queste indagini saranno resi noti nei nostri lavori successivi.

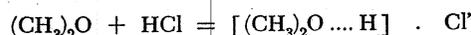
E per ritornare ancora sulle particolari esigenze di ambiente richieste dai germi alofili, siamo d'accordo coi precedenti autori i quali asseriscono che è difficile generalizzare e descrivere un substrato nutritivo e le condizioni più adatte per tutti gli alofili o anche per un certo numero di essi.

Noi, ad esempio, per i nostri ceppi isolati dalle pelli Packers americane

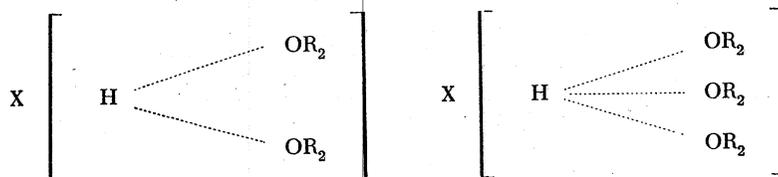
Poichè questi composti hanno carattere salino e la formazione del sale avviene per mezzo dell'ossigeno, sono stati chiamati « sali di ossonio ».

Però la formulazione di questi sali con l'ossigeno tetravalente, secondo Karrer (71), non spiega molte proprietà che si osservano in essi (ad esempio l'esistenza dell'etere e dell'acido non nel rapporto 1 : 1).

I sali di ossonio normali sono costituiti dall'ione complesso ossonico (paragonabile all'ione ammonico) e dall'anione acido:



I sali anormali (quelli cioè che, come sopra abbiamo detto, non hanno etere ed acido nel rapporto 1:1) si originano invece secondo gli schemi che giustificano così anche i numerosi idrati dei diversi tipi di sali ossonici:



abbiamo trovato che un substrato di agar-sale avente una definita composizione, come pure un caratteristico substrato a base di pappa di patate (45) influenzano in maniera molto marcata sia lo sviluppo, sia il metabolismo dei nostri alofili cromogeni.

Gli alofili non pigmentati hanno, in genere, esigenze nutritive meno accentuate rispetto a quelli pigmentati. Si sviluppano anche più rapidamente rispetto a quelli cromogeni e non richiedono particolari fattori di crescita [Stuart (133), Pierce (97), Gibbons (48), Clayton e Gibbs (21), Stuart e coll. (135), Spruit e Pijper (127), Lochhead (83), Dussault e La Chance (27), Venkataraman e Screenivasan (140), Lipman (82), Johnson e Harvey (69), Moore (91-92), McLeod e coll. (86), Boring (14), ZoBell (146), Flannery (36-38), ecc.].

Per quanto concerne poi i caratteri differenziali degli alofili da prendere in esame ai fini del loro inquadramento sistematico, i dubbi e le incertezze si accrescono notevolmente rispetto a tutti gli altri germi.

Noi già nel 1954 in alcune note sulla tassonomia delle Criptococcacee [Formisano (41-43)], ponemmo in rilievo tutta la difficoltà inerente alla scelta dei caratteri per un'adeguata classificazione.

Per i germi alofili, molte sono state le proposte finora avanzate. Sono note, infatti, quelle di Lochhead (84), di Elazari-Volcani (31), di Hill e White (61), di Schoop (117), di Sturges e coll. (136, 137), di Hof (62), di Kluyver e Baars (76), di Doudoroff (25, 26), ecc.

Di esse, alcune propongono di prendere a base sistematica la diversa sensibilità alle varie concentrazioni di NaCl del mezzo; altre la cromogenia unitamente alla sensibilità verso il cloruro di sodio; altre ancora la reversibilità o la irreversibilità di sviluppo degli alofili su mezzi non contenenti sale; ecc.

Ma solo quando saranno sufficientemente acquisite le informazioni circa la morfologia, la fisiologia, la nutrizione, la costituzione chimica delle cellule alofile, il loro metabolismo, sarà possibile una classificazione omogenea che dovrà, però ben s'intende, scaturire dalla collaborazione di tutti i ricercatori che si saranno occupati di questo argomento o per lo meno dalla maggior parte di essi.

Tassonomia dei microrganismi alofili obbligati delle pelli grezze salate.

Gli agenti microbici del « calore rosso » delle pelli salate fino ad oggi descritti sono diversi.

Tralasciando di considerare il lavoro di Stather (129, 130), che attribuì la causa della colorazione rossa a numerosi germi più o meno banali (*Micro-*

coccus pyogenes aureus, *Bac. mesentericus*, nonchè una *Sarcina* non meglio identificata, un *Corynebacterium* e due *Actinomyces* non specificati) e quello di Bergmann (11), che isolò dalle pelli arrossate numerosi ceppi che riportò a *Sarcina lutea*, *Sarcina aurantiaca*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus tetragenus*, ad una varietà di *Proteus*, una di *Actinomyces* e *Bac. subtilis*, che non furono in seguito accettati come la vera causa del « calore rosso » in quanto, in particolare, lo sviluppo era avvenuto su substrati inadatti, ricordiamo invece che Jordon-Lloyd e coll. (70), nel 1929, isolarono da numerosi campioni di sale marino alcuni ceppi di microrganismi a pigmento giallo, rosso o incolore che causavano la putrefazione delle pelli salate e che Harrison e Kennedy (57), in seguito allo studio del pleomorfismo dei germi alofili rossi in rapporto alle condizioni del mezzo e particolarmente alla concentrazione in sale, ritennero che dovessero essere riportati ad una sola specie a cui assegnarono il nome di *Pseudomonas salinaria*.

Successivamente Hausam (55), attribuì l'arrossamento iniziale delle pelli a *Bact. prodigiosum* e Horowitz-Wlassova (66), isolò un cromogeno rosso non meglio identificato, dalla regione intestinale del bestiame e che era capace di arrossare il lato carne delle pelli salate.

Lochhead (83), nel 1934, da tre pelli di origine geografica diversa descrisse tre specie di alofili a pigmento rosso, di cui una fu riportata alla *Pseudomonas salinaria*, una a *Sarcina litoralis* e alla terza, considerata una specie nuova, fu assegnato il nome di *Serratia cutirubra*.

Stuart (134), nel 1935 dichiarò di avere scoperto l'agente specifico del « calore rosso » in *Micrococcus rubens*. Questa affermazione, pur controllata in seguito, non potette però essere convalidata.

Nel 1940 Elazari-Volcani (31), in uno studio sulla microflora delle acque salate del Mar Morto isolò e descrisse, fra l'altro una nuova specie di germe alofilo: *Halobacterium marismortui* e riportò le specie precedentemente descritte al genere *Halobacterium*.

Anderson (1), nel 1954 descrisse molto sommariamente alcune specie nuove come *Halobacter australis*, *Halobacter universalis*, *Halobacter lloydii*, *Halobacter innocens*, *Halobacter lochhead* e ritrovò pure la *Pseudomonas salinaria* di Harrison e Kennedy che ribattezzò col nome di *Halobacter salinaria* ed infine la *Serratia cutirubra* di Lochhead che chiamò *Halobacter cutirubrum*.

Gli emendamenti proposti da Elazari-Volcani (31), furono accettati in seguito dall'ultima edizione (1957) del Bergey's Manual (18).

Sicchè, allo stato attuale delle cose, nell'Ordine *Pseudomonadales*, famiglia *Pseudomonadaceae*, esiste il genere *Halobacterium*, comprendente germi alofili obbligati, a bastoncino, talvolta pleomorfici, richiedenti almeno

il 12% di NaCl per lo sviluppo, e capaci di vegetare anche in substrati con sale fino a saturazione. Le specie sono talora mobili e monotriche, talaltra sono immobili; Gram-negative; in genere cromogene (con pigmento da arancione a rosso brillante, insolubile nell'acqua e del tipo carotenoidale); si conoscono però anche specie incolori; difficilmente attaccano i carboidrati con produzione di gas; riducono i nitrati ed occasionalmente con produzione di gas.

Questi alofili obbligati si trovano diffusi nelle acque del mare, nei laghi salati, nel sale naturale (salgemma e salmarino), sulle pelli e sui pesci salati ed, in genere, nei materiali conservati in salamoie.

Le forme allungate, nel Bergey's Manual del 1957, sono riunite in due gruppi: a) quelle che riducono i nitrati, ma non producono gas (*Halobacterium salinarium* Harrison e Kennedy emend. Elazari-Volcani; *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari-Volcani; *Halobacterium halobium* Petter emend. Elazari-Volcani); b) quelle che riducono i nitrati con produzione di gas (*Halobacterium marismortui* Elazari-Volcani; *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari-Volcani).

Ma molti altri alofili obbligati sono stati finora descritti. Tra i più recenti lavori ricordiamo quello di Boidin e Ginisty (13), del 1960, su pelli bovine salate affette da macchie rosse, raccolte presso l'Istituto di Ricerche per le Industrie del Cuoio di Lione (Lyon). Questi autori hanno descritto 5 tipi di alofili obbligati di cui due riportati a *Halobacterium cutirubrum*; un altro possedente molti caratteri affini all'*Halobacter innocens* di Anderson; un cocco riferibile a *Sarcina litoralis* di Poulsen e l'ultimo dei ceppi studiati a *Sarcina* sp. n. 63 R1 descritta da Lochhead nel 1934. Questi alofili, il più delle volte sono stati isolati da materiali diversi, in particolare da pesci salati o da acqua di mare o dal sale comune. Non manca però qualche alofilo obbligato isolato dal terreno. La caratteristica generale è che questi germi richiedono un optimum di concentrazione di NaCl, mai inferiore al 10% ed in genere aggirantesi intorno al 20%.

La loro posizione sistematica è però quanto mai diversa, come appare nella tabella che segue in cui sono riuniti tutti quei germi alofili obbligati fino ad oggi più estesamente studiati (Tab. n. 6).

Come si evidenzia da essa, gli alofili obbligati sono stati ascritti non solo agli Schizomiceti, ma anche agli Actinomiceti. I primi, però, sono molto più numerosi e le famiglie più rappresentate sono le *Pseudomonadaceae*, le *Achromobacteriaceae*, le *Micrococcaceae*, le *Rhizobiaceae*, ma non mancano neppure le *Bacteroidaceae* e le *Spirillaceae*. Fra gli Actinomiceti sono rappresentate le famiglie *Mycobacteriaceae* e le *Actinomycetaceae*.

Solo però, approfondendo le indagini sui caratteri morfo-fisiologici e bio-

Numero d'ordine (in base alla priorità)	GENERE e SPECIE	F a m i g l i a	Concentrazione optimum di NaCl %
1	<i>Sarcina litoralis</i>	Micrococcaceae	20 — 24
2	<i>Micrococcus morrhuae</i>	Micrococcaceae	24
3	<i>Spherotheca salinaria</i>	Spherophoraceae	—
4	<i>Halobacterium salinarum</i>	Pseudomonadaceae	18 — 25
5	<i>Micrococcus halestorga</i>	Pseudomonadaceae	25
6	<i>Achromobacter pikowsky</i>	Achromobacteraceae	15
7	<i>Micrococcus pikowsky</i>	Micrococcaceae	16
8	<i>Flavobacterium halophilum</i>	Achromobacteraceae	20 — 25
9	<i>Halobacterium halobium</i>	Pseudomonadaceae	20 — 27
10	<i>Halobacterium trapanicum</i>	Pseudomonadaceae	18 — 25
11	<i>Micrococcus roseus halophilus</i>	Micrococcaceae	15 — 20
12	<i>Halobacterium cutirubrum</i>	Pseudomonadaceae	20 — 27
13	<i>Halococcus litoralis</i>	Micrococcaceae	10 — 15
14	<i>Bacteroides halosmophilus</i>	Bacteroidaceae	13 — 15
15	<i>Mycococcus ruber</i>	Mycobacteriaceae	10
16	<i>Nocardia rubra</i>	Actinomycetaceae	10
17	<i>Vibrio costicolus</i>	Spirillaceae	10 — 17
18	<i>Vibrio halonitrificans</i>	Spirillaceae	10
19	<i>Pseudomonas halestorga</i>	Pseudomonadaceae	12
20	<i>Chromobacterium marismortui</i>	Rhizobiaceae	12
21	<i>Halobacterium marismortui</i>	Pseudomonadaceae	18 — 25
22	<i>Phytobacterium cryosthasia</i>	Pseudomonadaceae	10
23	<i>Phytobacterium subrubra</i>	Pseudomonadaceae	10
24	<i>Acinetobacter ureasophorum</i>	Achromobacteraceae	10
25	<i>Beneckea labra</i>	Achromobacteraceae	10
26	<i>Beneckea lipophaga</i>	Achromobacteraceae	10
27	<i>Beneckea hyperoptica</i>	Achromobacteraceae	10
28	<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	Micrococcaceae	10
29	<i>Halobacter australis</i>	Pseudomonadaceae	18 — 25
30	<i>Halobacter universalis</i>	Pseudomonadaceae	18 — 25
31	<i>Halobacter lloydii</i>	Pseudomonadaceae	—
32	<i>Halobacter innocens</i>	Pseudomonadaceae	—
33	<i>Halobacter lochheadi</i>	Pseudomonadaceae	—

Sorgente ed Habitat	Autore ed Anno	
Pelli e pesci salati	Poulsen, 1879	
Aringhe e pesci arrossati	Klebahn, 1919	
Pesci salati	(Harrison e Kennedy, 1922);	Brisou, 1954
Salmarino	(Harrison e Kennedy, 1922),	Elazari - Volcani, 1940
Acqua di mare	Bergey e coll., 1927	
Acqua di mare	Bergey e coll., 1927	
Acqua di mare	Bergey e coll., 1930	
Acqua di mare	Bergey e coll., 1930	
Pesci salati	(Petter, 1931),	Elazari - Volcani, 1940
Giacimenti salini di Bergen (Norvegia) e acque del Mar Morto	(Petter, 1931),	Elazari - Volcani, 1940
Saline della Crimea	Petrowa, 1933	
Acque del mare e salmarino	(Lochhead, 1934)	Elazari - Volcani, 1940
Pesci salati	Schoop, 1935	
Pesci e salmarino	Baumgartner, 1937	
Terreno	Krassilnikov, 1938	
Terreno	Krassilnikov, 1938	
Carni salate	Smith, 1938	
Carni salate	Smith, 1938	
Acque del Mar Morto	Elazari - Volcani, 1940	
Acque del Mar Morto	Elazari - Volcani, 1940	
Acque del Mar Morto	Elazari - Volcani, 1940	
Fango marino	(Campbell e Williams, 1951)	Brisou, 1955
Fango marino	(Campbell e Williams, 1951)	Brisou, 1955
Fango marino	(Campbell e Williams, 1951)	Brisou, 1954
Fango ed acqua di mare	Campbell e Williams, 1951	
Fango ed acqua di mare	Campbell e Williams, 1951	
Fango ed acqua di mare	Campbell e Williams, 1951	
Carni salate	Robinson e Gibbons, 1952	
Pelli e pesci salati	Anderson, 1954	
Pelli e pesci salati	Anderson, 1954	
Pelli e pesci salati	Anderson, 1954	
Pelli e pesci salati	Anderson, 1954	
Pelli e pesci salati	Anderson, 1954	

chimici delle singole specie, sarà possibile, forse avere una più precisa conoscenza, anche e soprattutto ai fini sistematici, delle specie stesse.

* * *

Come abbiamo detto in precedenza le nostre attuali ricerche mirano innanzitutto alla conoscenza della causa primaria e delle cause concorrenti perchè si verifichi sulle pelli salate il fenomeno di « calore rosso ».

Le indagini che andremo svolgendo prenderanno pertanto in esame ed in maniera accurata il problema testè affacciato.

Le pelli, costituenti la materia prima per le indagini stesse, sono quelle Packers americane, su cui più accentuatamente si rinviene l'alterazione.

Queste pelli, come appare dalle figg. n. 1 e n. 2 sono rappresentate in genere da gropponi di vitello, senza testa nè coda, salate e piegate in pacchi, quindi spedite, attraverso gli oceani, sui diversi continenti.

All'apertura dei colli contenenti le pelli predette, spessissimo si rinven- gono esemplari affetti da « calore rosso ». La fig. n. 3 mostra una ristretta zona intensamente macchiata.

Eseguendo preparati per impronta sulle parti apparentemente sane (figura n. 4 e n. 7) e su quelle evidentemente macchiate (figg. 5-6 e 8-9), si constatano, in particolare su queste ultime, forme microbiche (per lo più cocciche o batteriche), spesso riunite in ammassi.

In primo luogo occorre subito anticipare che non si prestano i colori acidi di anilina per la colorazione della maggior parte delle specie, mentre con la colorazione basica e successiva scolorazione, come abbiamo già indicato in precedenza, è possibile evidenziare una florula microbica costituita da germi vari (micrococchi, streptococchi, sarcine, batteri allungati, conidi e spore actinomicetiche ed ifomicetiche; non mancano talora anche forme protozoarie). Che la flora microbica sia costituita da tutti alofili obbligati, o che tutti i germi siano la causa dell'alterazione, sono fatti questi sui quali stiamo indagando e su di essi riferiremo in una prossima nota.

Attualmente abbiamo isolato in totale n. 236 ceppi di alofili obbligati ed alotolleranti che formano oggetto di indagine per conoscerne i caratteri morfologici, colturali e biochimici e saranno considerati agenti specifici del « calore rosso » solo se nelle prove di reinfezione su pelli sane saranno capaci di riprodurre l'alterazione.

Non prenderemo in considerazione i germi banali, cioè quelli sviluppati su agar comune, nè la microfauna, in quanto i primi costituiscono la microflora epifitica naturale delle pelli; la seconda, cioè la microfauna è solo occasionale: tutti però si originano dall'ambiente esterno, particolarmente dal



Fig. n. 1

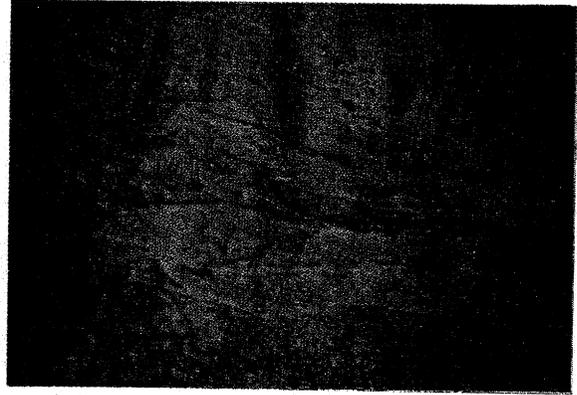


Fig. n. 2

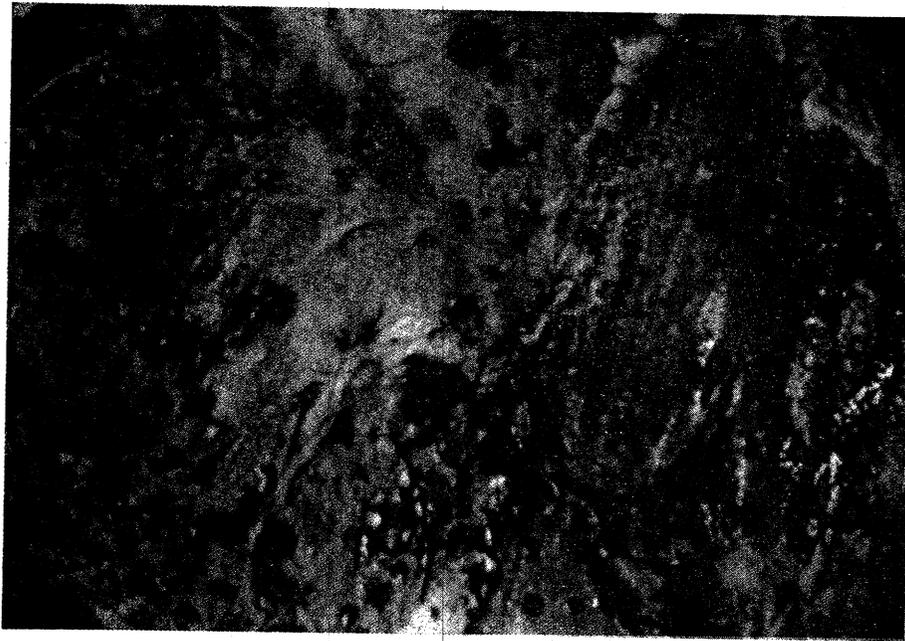


Fig. n. 3

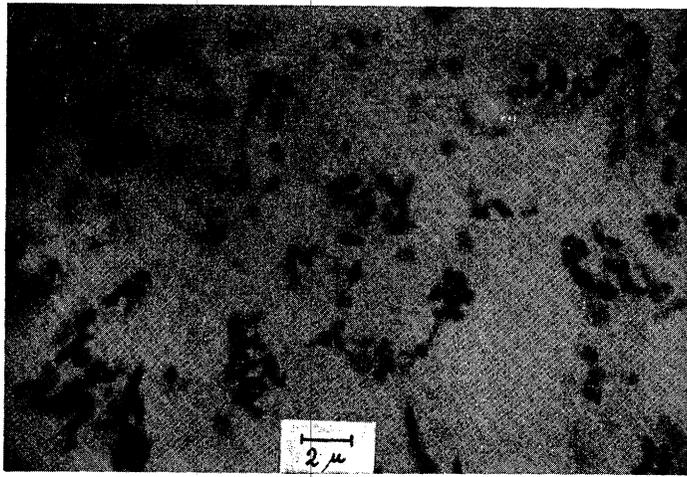


Fig. n. 4

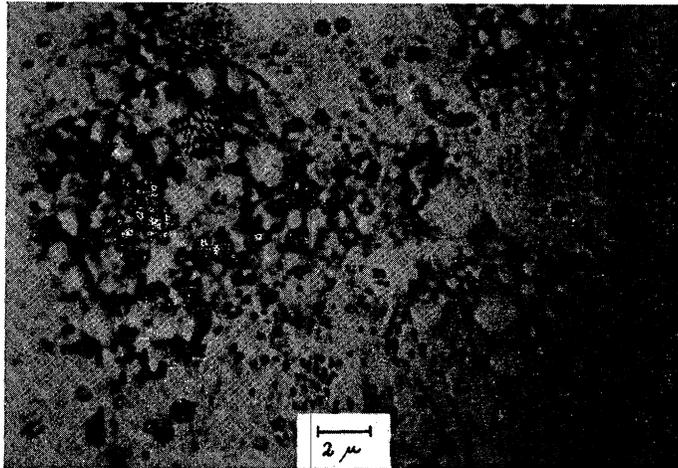
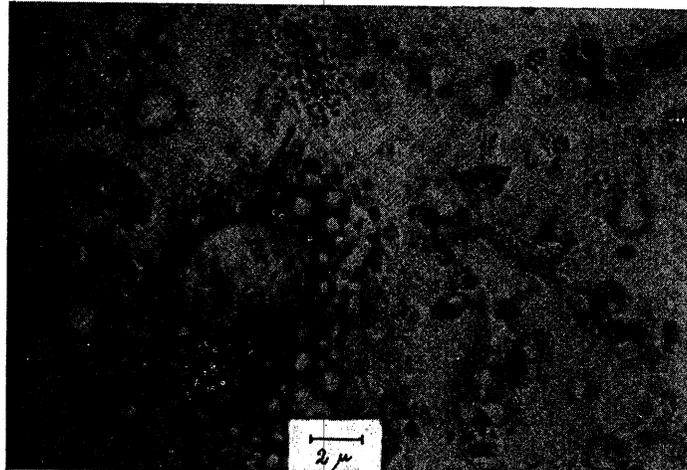


Fig. n. 5



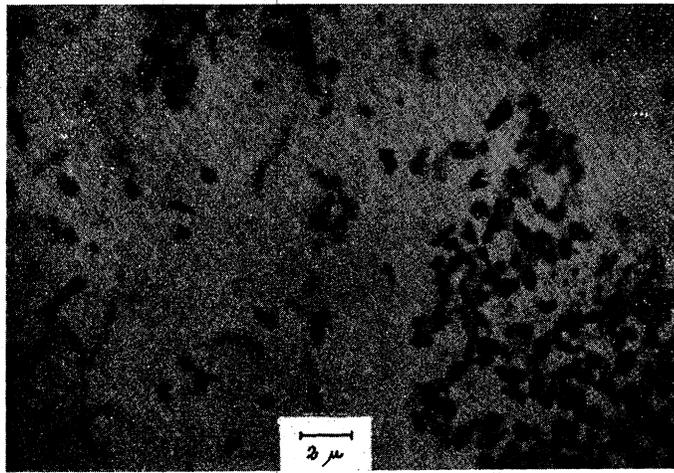


Fig. n. 7

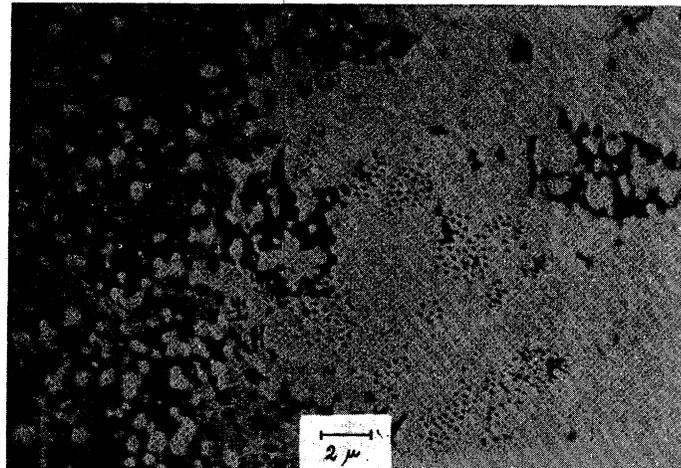


Fig. n. 8

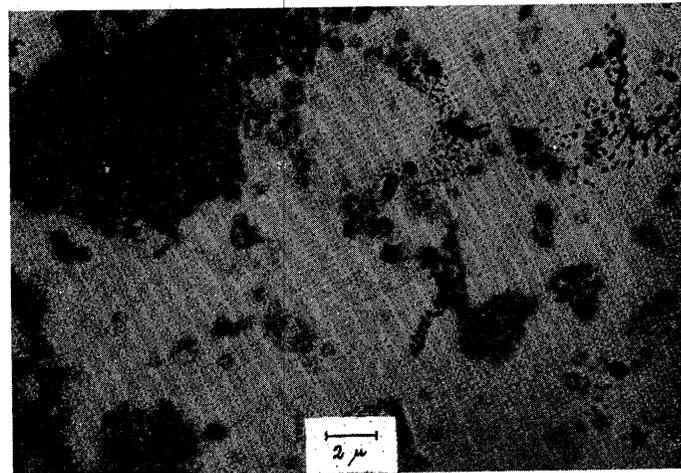


Fig. n. 9

terreno, in quanto le pelli, dopo la mattazione degli animali da macello, vengono lasciate giacenti sul terreno per periodi di tempo più o meno prolungati, prima di essere sottoposte alla salatura.

Il piano di sperimentazione prefissato e che attualmente è in corso di svolgimento comprende, pertanto, fra l'altro:

a) lo studio dei caratteri dei germi isolati e ciò con l'evidente proposito di poterli identificare tassonomicamente;

b) lo studio della struttura istologica e della composizione chimica della pelle sana e di quella alterata, onde poter stabilire, in particolare, in qual modo i germi penetrano nel tessuto dermico e quali modificazioni chimico-fisiche essi inducono sulla pelle stessa;

c) la ricerca di metodiche e di mezzi atti a prevenire o ad eliminare l'alterazione di « calore rosso ».

Considerazioni e conclusioni.

In base ai reperti della letteratura scientifica già nota ed attraverso i risultati delle prime indagini da noi condotte su pelli Packers americane, affette da « calore rosso », anche se non è possibile, per ora, trarre conclusioni risolutive intorno al vasto e complesso problema dello studio microbiologico ed isto-citologico dell'alterazione, nè d'altro canto e ben s'intende è possibile indicare mezzi o metodiche per impedire o ridurre il danno, pur tuttavia, i risultati già acquisiti ne chiariscono alcuni aspetti, offrendoci, nel contempo nuovo materiale per il prosieguo delle indagini.

Possiamo, perciò, ritenere intanto che:

1) L'alterazione nota, comunemente, come « calore rosso » delle pelli bovine salate è da ritenersi di origine microbica: essa però non è la conseguenza dell'attività di un solo germe, in quanto sono responsabili diversi microrganismi schizomicetici, alofili obbligati e cromogeni, rappresentati da forme batteriche (più numerose) e da forme cocciche.

Non mancano però germi alofili apigmentati e germi alotolleranti ai quali può, senza dubbio, attribuirsi un'azione concomitante o talvolta anche esaltatrice della vera causa alterativa, legata quest'ultima, come si è detto, allo specifico metabolismo degli alofili cromogeni.

2) Le caratteristiche macroscopiche dell'alterazione possono così riassumersi:

a) Presenza di macchie rosse (da rosa pallido a rosso vinoso intenso), talora isolate, tal'altra confluenti in zone molto estese, interessanti addirittura anche tutta la superficie della pelle.

b) Presenza delle macchie suddette sul « lato carne » delle pelli e, particolarmente nei punti esposti ai fattori dell'ambiente esterno.

c) Relativa facilità di rimozione meccanica delle zone colorate, mediante raschiamento, ma con conseguente relativa facilità del riprodursi dell'alterazione.

d) Facilità di trasmissione degli agenti infettanti e del danno correlativo mediante semplice contatto di una pelle sana con una parte di pelle alterata.

e) Anche se apparentemente il danno sembra limitato al « lato carne » e senza apprezzabile alterazione macroscopica della pelle, non è raro osservare in corrispondenza, sul « lato fiore », una alquanto accentuata depilazione ed, all'esame istologico delle parti infette, una modificazione più o meno profonda dei tessuti della pelle stessa. Il danno risulta evidente, con conseguente deprezzamento del valore commerciale delle pelli, prima delle operazioni di concia e di tintura.

3) L'origine dell'alterazione risiede particolarmente nel sale adoperato nei processi di salatura delle pelli fresche e nel terreno che sempre imbratta le pelli stesse, specie quando queste, dopo la mattazione degli animali da macello, restano giacenti sul terreno per periodi di tempo spesso molto prolungati.

4) Le specie microbiche causanti l'alterazione, in quanto posseggono specifiche proprietà morfo-fisio-biologiche e culturali, sono di difficile coltivazione, caratterizzazione e conservazione, e pertanto richiedono mezzi e metodi particolari per effettuarne la diagnosi. Parecchie di queste metodiche, da noi stessi elaborate, ci hanno consentito la coltura e lo studio del loro metabolismo, come verrà indicato in una nota successiva.

Solo perciò quando saranno conosciute, per quanto possibile nella loro interezza, i caratteri biologici degli agenti microbici, i diversi momenti di penetrazione di questi negli strati della pelle, le modificazioni fisico-chimiche indotte all'intima complessa struttura della pelle stessa, i vari fattori predi-

sponenti e concomitanti all'insorgere ed al diffondersi del danno, allora potrà essere orientata la scelta dei mezzi per prevenire, ridurre o impedire l'alterazione.

Ringrazio il Prof. Enrico Simoncini per aver favorito l'esecuzione di questo studio nei laboratori della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti in Napoli, ponendo a disposizione tutte le attrezzature necessarie per la ricerca.

*Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli
e delle Materie Concianti. Napoli - Torino.*

Direttore: Prof. Dott. ENRICO SIMONCINI

*Istituto di Microbiologia Agraria e
Tecnica dell'Università di Napoli.*

Direttore: Prof. Dott. SALVATORE RICCARDO

R I A S S U N T O

Nell'ambito di un particolareggiato piano di sperimentazione, fissato per conoscere le cause dell'alterazione nota col nome di « calore rosso » delle pelli bovine salate e per indicare eventuali metodiche per impedire il danno, dopo aver passato in rassegna i lavori compiuti sull'argomento da precedenti ricercatori, abbiamo dato conto dei risultati più significativi delle nostre prime indagini su pelli Packers americane indicando, nel contempo, i fatti che saranno presi in esame nel prosieguo delle nostre ricerche.

R E S U M E

On a établi un programme d'études bien défini, au bût d'expliquer les causes de l'altération sur les peaux de boeufs salées, connue comme « rougissement ». Ceci pour pouvoir indiquer les eventuelles methodiques pour l'empêcher.

On a examiné tous les études déjà parus dans la literature technique, et on a rapporté les résultats les plus signifiants obtenus au cours de ce travail sur les peaux Packer de provenience Americaine.

On a aussi indiqué les détails qu'on prendra en examen en suite.

S U M M A R Y

A detailed research plan has been established in order to ascertain the causes of the alteration on salted cattle hides, known as « Red Heat », with a view to devising possible methods for preventing the damage.

The literature concerning the researches carried out in this field by earlier investigators has been reviewed and the most signifying results attained by a personal investigation on American Packer hides have been reported.

Facts which will be considered in detail in forthcoming papers have also been pointed out.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Um die Ursachen des Rotwerdens gesalzener Rindhäute, die mit einer « Erhitzung » der Häute in Zusammenhang gebracht wird festzustellen, hat der Verfasser ein ausführliche Untersuchungsplan eingeleitet, um Unterlagen für eine Bekämpfung der Schädigung zu gewinnen.

Alle auf diesem Gebiet bisherigen Arbeiten wurden gründlich untersucht; man gibt nun ausführlichen Angaben über den ersten gemäss obiger Fragestellung wichtigsten Ergebnissen, im Rahmen des Untersuchungs über U.S.A. Packerhäute.

Zum Schluss folgen noch einige Ausblicke auf zukünftigen Entwicklungen dieser Arbeit, über die noch im Kauff zu nehmenden Zusammenhänge.

B I B L I O G R A F I A

1. ANDERSON H. — The reddening of salted hides and fish. *Appl. Microbiol.*, vol. 2, 1954, p. 64.
2. ANDERSON H. — The bacteriology of hide preservation. *Jour. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 33, 1949, p. 250.
3. BAAS - BECKING L. G. — Historical notes on salt and salt manufacture. *Sci. Monthly*, vol. 32, 1931, p. 434.
4. BARANIK - PIKOWSKY M. A. — Ueber den Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf die Limanbakterien. *Zentr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 70, 1927, p. 373.
5. BAUMGARTNER I. G. — The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile. *Food Research*, vol. 2, 1937, p. 321.
6. BAXTER R. M. — An interpretation of the effect of salts on the lactic dehydrogenase of « *Halobacterium salinarium* ». *Can. Jour. Microb.*, vol. 5, 1959, p. 47.
7. BAXTER R. M., GIBBONS N. E. — Effect of sodium and potassium chloride on certain enzymes of « *Micrococcus halodenitrificans* » and « *Pseudomonas salinaria* ». *Can. Jour. Microb.*, vol. 2, 1956, p. 599.
8. BAXTER R. M., GIBBONS N. E. — The glycerol dehydrogenases of « *Pseudomonas salinaria* », « *Vibrio costicolus* », and « *Escherichia coli* » in relation to bacterial halophilism. *Can. Jour. Biochem. a. Physiol.*, vol. 32, 1954, p. 206.
9. BECKER H. — Die Salzflecken. *Collegium*, 1912, p. 411.
10. BEDFORD R. H. — The discoloration of halibut by marine chromogenic bacteria. *Contr. Canad. Biol. a. Fisheries*, N. S., vol. 7, 1933, p. 427.
11. BERGMANN M. — On the red discoloration of hides and on salt stains. *Jour. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 13, 1929, p. 599.
12. BLANKOW B. J. — Lederindustrie d U.S.S.R. (Russia), 1933 in Petrowa E. K.: Mikrobiologie des Kochsalzes. *Ark. f. Mikrobiol.*, vol. 4, 1933, p. 326.
13. BODIN J., GINISTY A. M. — Bactéries provoquant des taches rouges sur peaux salées. *Bull. Assoc. Franc. Chim. Industr. d. Cuir*, vol. 22, n. 12, 1960, p. 205.
14. BORING J. R. — The mineral requirements for respiration of a marine bacterium. *Thesis Univ. Florida, Gainesville, Florida*, 1955.
15. BOWES J. H., ELLIOT R. J., MOSS J. A. — Collagen and the more soluble constituents of skin. *Jour. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 41, 1957, p. 249.

16. BOWES J. H., KENTEN R. H. — Some observations on the amino acid distribution of collagen, elastin and reticular tissue from different sources. *Biochem. Journ.*, vol. 45, 1949, p. 281.
17. BREED R. S. — The systematic relationship of the red chromogenic organisms *Jour. Bact.*, vol. 32, 1936, p. 357.
18. BREED R. S., MURRAY E. G., SMITH N. R. — *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 7^a ediz., Ed. Williams e Wilkins Comp. Baltimore, 1957.
19. BRISOU J. — *Microbiologie du milieu marin*. Ed. Medicales Flammarion, Paris, 1955.
20. CHIBNALL A. C. — Contribution of the analytical chemist to the problem of protein structure. *Jour. Soc. Leather Chem.*, vol. 30, 1946, p. 1.
21. CLAYTON W., GIBBS W. E. — Examination for halophilic microorganisms. *Analyst*, vol. 52, 1927, p. 395.
22. CLOAKE P. C. — Red discoloration (socalled « pink » or « pink eye ») on dried salted fish. *Food Invest. Board Spec. Report* n. 18, 1923.
23. DAKIN H. D. — Die aminosäuren der Gelatine. *Jour. Biolog. Chem.*, vol. 44, 1920, p. 499.
24. DINAH A., GIBBONS N. E. — Turbidity of suspensions and morphology of red halophilic bacteria as influenced by sodium chloride concentration. *Can. Jour. Microb.*, vol. 6, 1960, p. 535.
25. DOUDOROFF M. — Experiments on the adaptation of « *Escherichia coli* » to sodium chloride. *Jour. Gen. Physiol.*, vol. 23, 1940, p. 585.
26. DOUDOROFF M. — Studies on the huminous bacteria. I. Nutritional requirements of some species, with special reference to methionine. *Jour. Bact.*, vol. 44, 1942, pag. 451.
27. DUSSAULT H. P., LA CHANCE R. A. — Improved medium for red halophilic bacteria from salt fish. *Jour. Fisheries Research Board Can.*, vol. 9, 1952, p. 157.
28. EASTOE J. E. — Amino acid composition of collagen and gelatin of Man, Ox, Pig, Whale and Wallaby. *Biochem. Journ.*, vol. 61, 1955, p. 589.
29. EGAMI F. — Recherches biochimiques sur les bactéries halotolerantes et halophiles *Bull. Soc. Chim. Biol.*, vol. 37, 1955, p. 207.
30. EGAMI F., YAMADA R., SHIO I. — Sur un méthode simple pour l'extraction des enzymes bactériens. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, vol. 147, 1953, p. 1531.
31. ELAZARI - VOLCANI B. — Studies on the microflora of the Dead Sea. *Thesis, Hebrew Univ., Jerusalem, Israel*, 1940.
32. FABIAN F. W., WINSLOW J. M. — The influence upon bacterial viability of various anions in combination with sodium. *Jour. Bact.*, vol. 18, 1929, p. 265.
33. FALK I. S. — The role of certain ions in bacterial physiology. *Abstr. Bact.*, vol. 8, 1923, p. 141.

34. FARLOW W. G. — On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season. *U. S. Comm. Fish. and Fisheries*, Rept. 1978 (pt. 6), 1880, p. 969.
35. FARLOW W. G. — Vegetable parasites of codfish. *U. S. Fishery Comm. Bull.*, vol. 6, 1886, p. 1.
36. FLANNERY W. L. — Salt desideratum of « *Vibrio costicolus* » an obligate halophilic bacterium. *Dissertation, Univ. Maryland, College Park, Maryland*, 1953.
37. FLANNERY W. L. — Current status of Knowledge of halophilic bacteria. *Bact. Reviews*, vol. 20, n. 2, 1956, p. 49.
38. FLANNERY W. L. — Synthetic media for two nonpigmented obligate halophilic bacteria. *Bacter. Proc.*, vol. 55, 1955, p. 26.
39. FLANNERY W. L., DOETSCH R. N., HANSEN P. A. — Salt desideratum of « *Vibrio costicolus* », an obligate halophilic bacterium. II. Effect of salts on the oxidation of glucose. *Jour. Bact.*, vol. 66, 1953, p. 526.
40. FODA I. O., VANGHN R. H. — Salt tolerance in the genus « *Aerobacter* ». *Food Techn.*, vol. 4, 1950, p. 182.
41. FORMISANO M. — Due torulopsidacee isolate da formaggio « provolone » e loro posizione sistematica. *Ann. Tecnica Agraria*, vol. 16, 1950, p. 40.
42. FORMISANO M. — Variazioni morfologiche di « *Torulopsis corallina* » (Saito) Cif. et Red. e considerazioni sulla sistematica delle Torulopsidaceae. *Ann. Microbiol.*, vol. 5, n. 3-6, 1953, p. 116.
43. FORMISANO M. — Studio dell'influenza di alcuni fattori dell'ambiente sullo sviluppo e sulla morfologia di « *Torulopsis corallina* ». *Nuovi Ann. d'Igiene e Microbiol.*, vol. 5, n. 5, 1954, p. 350.
44. FORMISANO M. — *Lineamenti di tecnica commerciale dei prodotti agricoli*, ed. Liguri, Napoli, 1960, p. 248-252.
45. FORMISANO M. — Ricerche sul « calore rosso » delle pelli salate. II. Isolamento e caratterizzazione degli agenti microbici causanti l'alterazione. *In corso di stampa*.
46. FREDERICK E. — On the bacterial flora of the Greay Salt and the viability of other microorganisms in Great Salt Lake water. *Thesis, Univ. Utah, Salt Lake City, Utah*, 1924.
47. GAYON M., CARLES M. — Rouge de la morue. *Rev. Sanit. Bordeaux et Provence*, vol. 57, 1886, p. 47.
48. GIBBONS N. E. — Bacteria associated with reddening of salt fish. *Jour. Biol. Board Can.*, vol. 3, 1936, p. 70.
49. GIBSON N. E. — Halophilic bacteria. *Chem. Canada*, vol. 18, 1956, p. 56.
50. GRASSMANN W. — Physikalische Ledereigenschaften in Abhängigkeit von Hautstruktur und Gerbung. *Das Leder*, vol. 1, n. 3, 1950, p. 57.

51. GRASSMANN W., SCHLEICH H. — The carbohydrate content of collagen. *Biochem. Zeit.*, vol. 277, 1935, p. 320.
52. GROSS J., HIGHBERGER J., SCHMITT F. O. — Some factors involved in the fibrogenesis of collagen in vitro. *Proc. Soc. Exper. Biolog. Med.*, vol. 80, 1952, p. 462.
53. GUSTAVSON K. H. — *The chemistry and reactivity of Collagen*, ed. Academic Press Inc. Publi., New York, 1956.
54. HANKINS O. J., SULZBACHER W. L., KAUFFMAN W. R., MAYO M. E. — Factors affecting the keeping quality of bacon. *Food Technol.*, vol. 4, 1950, p. 33.
55. HAUSAM W. — Zur Bakteriologie des Rotwerdens von Salz häuten. *Collegium*, n. 729, 1931, p. 12.
56. HANZAWA H., TAKEDA G. — On the reddening of boned codfish. *Arch. f. Mikrobiol.*, vol. 2, 1931, p. 1.
57. HARRISON F. C., KENNEDY M. E. — The red discoloration of cured codfish. *Roy. Soc. Canada, Proc. a, Trans.*, sez. 5, vol. 16, 1922, p. 101.
58. HESS E. — Studies on salt fish. VIII. Effects of various salt on preservation. *Jour. Fisheries Resear. Board Canad.*, vol. 6, 1942, p. 1.
59. HESS E. — Studies on salt fish. IX. Effect of environment upon the growth of red halophilic bacteria. *Jour. Fisheries Resear Board Canad.*, vol. 6, 1942, p. 10.
60. HESS E., GIBBONS N. E. — Effect of disinfectants and preservatives on red halophilic bacteria. *Jour. Fisheries Resear. Board Canad.*, vol. 6, 1942, p. 17.
61. HILL J. H., WHITE E. C. — Sodium chloride for the separation of certain gram positive cocci from gram negative bacilli. *Jour. Bact.*, vol. 18, 1929, p. 43.
62. HOF T. — Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Rec. Trav. Botan. Neerl.*, vol. 32, 1935, p. 92.
63. HOYE K. — Recherches sur la moisure de bacalao et quelque autres microorganismes halophiles. *Bergens Museum Asrbog*, vol. 12, 1906, p. 3.
64. HOYE K. — Untersuchungen über die Schimmelbildung des Bergfischer. *Bergens Museum Asrbog*, vol. 4, 1908, p. 1.
65. HOLM G. E., SHERMAN J. M. — Salt effects in bacterial growth. *Jour. Bact.*, vol. 6, 1921, p. 511.
66. HOROWITZ - WLIASSOWA L. M. — Ueber die Rotfärbung gesalzener Därme (« der rote hund »). *Zentr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 85, 1931, p. 12.
67. HOTCHKISS M. — The stimulating and inhibitive effect of certain cations on bacterial growth. *Jour Bact.*, vol. 8, 1923, p. 141.
68. INGRAM M. — A theorem relating the action of salts on bacterial respiration to their influence on the solubility of proteins. *Proc. Roy. Soc. London*, ser. B, vol. 134, 1947, p. 181.

69. JOHNSON F. H., HARVEY E. N. — Bacterial luminescence, respiration and viability in relation to osmotic pressure and specific salts of the sea. *Jour. Cellular Comp. Physiol.*, vol. 11, 1938, p. 213.
70. JORDON - LLOYD D. — Red heat in salted hides. *Jour. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 13, 1929, p. 538.
71. KARRER P. — *Trattato di Chimica organica*. VII ediz., Ed. Sansoni, Firenze, 1942, p. 126 - 137.
72. KATZNELSON H., LOCHHEAD A. G. — Growth factor requirements of halophilic bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 64, 1952, p. 97.
73. KATZNELSON H., ROBINSON J. — Observations on the respiratory activity of certain obligately halophilic bacteria with high salt requirements. *Jour. Bact.*, vol. 71, 1956, p. 244.
74. KATZNELSON H., WHITE A. H. — Nutritional requirements of « *Pseudomonas nigrificiens* » as related to growth and pigment production. *Can. Jour. Research*, ser. C, vol. 28, 1950, p. 706.
75. KELLERMANN K. F., SMITH N. R. — Halophilic and lime precipitating bacteria. *Zentr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 45, 1916, p. 371.
76. KLUYVER A. J., BAARS J. K. — On some physiological artefacts. *Proc. Koninkl. Akad. Wetenschaf*, Amsterdam, vol. 35, 1932, p. 370.
77. KOPPENHOEFER R. M. — Die Lipoide von Schaffellen. *Jour. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 33, 1938, p. 203.
78. LE DANTEC A. — Etude de la morue rouge. *Ann. Inst. Pasteur*, vol. 5, 1891, p. 656.
79. LEFREVE E., ROUND L. A. — A preliminary report upon some halophilic bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 4, 1919, p. 177.
80. LEUTSKER — in Highberger J. H. — A half century of progress in collagen chemistry. *Jour. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 48, 1953, p. 704.
81. LIEBERT F. — Ueber die Ursache des « Rotwerdens » von Pökelhering. *Zentr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 80, 1930, p. 33.
82. LIPMAN C. B. — The concentration of sea-water as affecting its bacterial population. *Jour. Bact.*, vol. 12, 1926, p. 311.
83. LOCHHEAD A. G. — Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Canad. Jour. Resear.*, vol. 10, 1934, p. 275.
84. LOCHHEAD A. G. — Notes on the taxonomic position of the red chromogenic halophilic bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 45, 1943, p. 574.
85. LLOYD D. J., MARRIOTT R. H., ROBERTSON M. E. — « Red Heat » in salted hides. *Jour. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 13, 1929, p. 538.
86. MAC LEOD R. A., ONOFREY E., NORRIS M. E. — Nutrition and metabolism of marine bacteria. I. Survey of nutritional requirements. *Jour. Bact.*, vol. 68, 1954, p. 680.

87. MAC LEOD R. A., SNELL E. E. — The relation of ion antagonism to the inorganic nutrition of lactic acid bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 59, 1950, p. 783.
88. MAO T. J., RODDY W. T. — The dry strength of collagen fiber aggregates as influenced by tannery processes. *Journ. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 45, n. 3, 1950, p. 131.
89. MAXWELL M. E., LENNOX A. G. — Bacteria responsible for the loosening of wool on sheepskins. *Jour. Inter. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 28, 1944, p. 190.
90. MC LAUGHIN G. D., THEIS E. R. — Notes on animal skin composition. *Jour. Americ. Leather Chem. Assoc.*, vol. 19, n. 8, 1924, p. 428.
91. MOORE H. N. — The use of silica gels for the cultivation of halophilic organisms. *Jour. Bact.*, vol. 40, 1940, p. 409.
92. MOORE H. N. — The use of silica gels for the cultivation of halophilic organisms. II. Quantitative determination. *Jour. Bact.*, vol. 41, 1941, p. 317.
93. MOORE S., STEIN W. H. — in O'Flaherty F., Roddy W. T., Lollar R. M. - *The chemistry and technology of Leather*. Ed. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1956.
94. O'FLAHERTY F., RODDY W. T., LOLLAR R. M. — *The chemistry and technology of Leather*, vol. I, ed. Chapman & Hall, London, 1956.
95. PAYNE J. I., SEHGAL S. N., GIBBONS N. E. — Immersion refractometry of some halophilic bacteria. *Canadian Jour. Microb.*, vol. 6, 1960, p. 9.
96. PETTER H. F. — On bacteria of salted fish. *Komintl. Akad. Wetenschap. Amsterdam*, vol. 34, 1931, p. 1417.
97. PIERCE G. J. — The Salton Sea. *Carnegie Inst. Wash.* n. 193, 1914.
98. POULSEN V. A. — On Nogle Mikroskopiske Planteorganismer et Morfologisk og Kritisk studie. *Vidensk. Meddel. Dausk. Natur. Forening Kiobanhavn*, vol. 31, 32, 1880, p. 231.
99. PREVOT A. R. — Les bactéries marines et les problèmes de biologie qu'elles soulèvent. *Nature (Paris)*, n. 3280, 1958, p. 325.
100. RAPPIN D. — The dangers of table salt. *Jour. Amer. Med. Assoc.*, vol. 75, 1920, p. 618.
101. RAY L. R., BEEKMAN E. — Equipment for tanning of hides and skins. *Food a. Agric. Organization U. N. Food a. Agr. Devel.*, n. 13, 1951.
102. RICHTER O. — Natrium ein notwendiges Nährelement für eine marine mikroaerophile Leucht bakterie. *Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Kl. Denkschr.*, vol. 101, 1928, p. 261.
103. ROBERTSON M. E. — A note on the cause of certain red colorations on salted hides a comparison of the growth and survival of halophilic or salt-loving organisms and

some ordinary organisms of dirt and putrefaction on media of varying salt concentrations. *Jour. Hygiene*, vol. 31, 1931, p. 84.

104. ROBERTSON M. E. — « Red - Heat » its causes and prevention. *Jour. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, vol. 16, 1932, p. 564.
105. ROBINSON J. — A possible explanation of microbial halophilism. *Thesis Mc Gill Univ., Montreal, Canada*, 1950.
106. ROBINSON J. — The effects of salts on nitritase and lactic acid dehydrogenase activity of « *Micrococcus halodenitrificans* ». *Can. Jour. Botany*, vol. 30, 1952, p. 155.
107. ROBINSON J., GIBBONS N. E. — The effect of salts on the growth of « *Micrococcus halodenitrificans* » (n. sp.). *Can. Jour. Botany*, vol. 30, 1952, p. 147.
108. ROBINSON J., GIBBONS N. E., THATCHER F. S. — A mechanism of halophilism in « *Micrococcus halodenitrificans* ». *Jour. Bact.*, vol. 64, 1952, p. 69.
109. ROBINSON J., KATZNELSON H. — Aspartate - glutamate transaminase in a red halophilic bacterium. *Nature*, vol. 172, 1953, p. 672.
110. ROCKWELL G. E., EBERTZ E. G. — How salt preserves. *Jour. Infect. Diseases*, vol. 35, 1924, p. 573.
111. RUBENTSCHIK L. — Ueber einige neue Urobakterienarten. *Zentr. f. Bakt., II Abt.* vol. 66, 1925, p. 161.
112. RUBENTSCHIK L. — Zur Nitrification bei hohen Salz - konzentrationen. *Zentr. f. Bakt., II Abt.*, vol. 77, 1929, p. 1.
113. SASLAWSKY A. S. — Ueber eine obligat halophile Thionsäurebakterie. *Zentr. f. Bakt., II Abt.*, vol. 72, 1927, p. 236.
114. SASLAWSKY A. S., HARZSTEIN N. — Ueber die Einwirkung gewisser Salze auf obligat-halophile Thionsäurebakterien. *Zentr. f. Bakt., II Abt.*, vol. 80, 1930, p. 165.
115. SCHNEIDER F. — Ueber die chemische Zusammensetzung des Kollagens. *Collegium*, vol. 839, 1940, p. 97.
116. SCHNEIDER L. H. — The effects of potassium on bacterial luminescence intensity with reference to temperature and pressure conditions. *Jour. Cellular Comp. Physiol.*, vol. 42, 1953, p. 285.
117. SCHOOP G. — Obligat halophile Mikroben. *Zentr. f. Bakt., I Abt.*, vol. 134, 1955, p. 14.
118. SCHOOP G. — « *Halococcus litoralis* », ein obligat halophiler Farbstoffbildner. *Deut. Tierarztl. Woch.*, vol. 43, 1935, p. 52.
119. SEHGAL S. S., GIBBONS N. E. — Effect of some metal ions on the growth of « *Halobacterium cutirubrum* ». *Can. Jour. Microb.*, vol. 6, 1960, p. 165.
120. SEVERENS J. M., TANNER F. W. — The inheritance of environmentally induced characters in bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 49, 1945, p. 383.

121. SHEWAN J. M. — Some bacteriological aspects of fish preservation. *Chemistry a. Industry*, vol. 20, 1942, p. 312.
122. SIMONCINI E. — L'analisi delle pelli da macello. Memoria presentata al Congr. Intern. Chimici del Cuoio, Amsterdam, 14 settembre 1933.
123. SMITH W. — Evidence of a bacterial flora indigenous to the Great Salt Lake. *Thesis, Univ. Utah, Salt Lake City, Utah*, 1936.
124. SMITH F. B. — An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios (n. spp.). *Proc. Roy. Soc. Queenshand*, vol. 49, 1938, p. 29.
125. SMITHIES W. R., GIBBONS N. E. — The dexossiribose nucleic acid slime layer of some halophilic bacteria. *Can. Jour. Microb.*, vol. 1, 1955, p. 614.
126. SMITHIES W. R., GIBBONS N. E., BAYLER S. T. — The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. *Can. Jour. Microb.* vol. 1, 1955, p. 605.
127. SPRUIT C. J., PIJPER A. — An obligate halophilic bacterium from solar salt. *Antony van Leeuwenhock Jour. Microbiol. Serol*, vol. 18, 1952, p. 190.
128. STAHL C. A. — Der Einfluss von Kochsalz, Soda, Chloramin-Heyden, und Sublimat. *Zentr. f. Bakt., II Abt.*, vol. 79, 1929, p. 16.
129. STATHER F. — Untersuchungen über salzflecken. *Collegium*, n. 703, 1928, p. 567.
130. STATHER F. — « Rote verfärbung » und « rote erhitzung » auf gesalzene häuten. *Collegium*, n. 720, 1930, p. 151.
131. STATHER F., LIEBSCHER E. — Ueber das Rotwerden gesalzener Rohhäute. *Collegium*, n. 713, 1929, p. 427.
132. STATHER F., LIEBSCHER E. — Zur Bakteriologie des Rotwertend gesalzener Rohhäute. *Collegium*, n. 713, 1929, p. 192.
133. STUART L. S. — Isolation of halophilic bacteria from soil, water, and dung. *Food Research*, vol. 2, 1938, p. 417.
134. STUART L. S. — The morphology of bacteria causing reddening of salted hides. *Jour. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 30, 1935, p. 226.
135. STUART L. S., FREY R. W., JAMES H. L. — Microbiological studies of salt in relation to the reddening of salted hides. *U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.*, n. 383, 1933.
136. STURGES W. S. — Studies on halophilic microorganisms. The flora of meat curing solutions. *Abstr. Bact.*, vol. 7, 1923, p. 11.
137. STURGES W. S., HEIDMAN D. — Observation on the constancy of the proposed grouping of the halophilic microorganisms. *Abstr. Bact.*, vol. 9, 1925, p. 2.
138. TOMLINSON N., MAC LEOD R. A. — Nutrition and metabolism of marine bacteria. The participation of Na⁺, K⁺ e Mg⁺⁺ salts in the oxidation of exogenous substrates by a marine bacterium. *Can. Jour. Microb.*, vol. 3, 1957, p. 627.

139. TSUYUKI H., MAC LEOD R. A. — Ion antagonisms affecting glycolysis by bacterial suspensions. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 190, 1951, p. 711.
140. VENKATARAMAN R., SCREENIVASAN A. — Studies on the red, halophilic bacteria from salted fish and salt. *Proc. Indian Acad. Sci.*, vol. 319, 1954, p. 17.
141. VENKATARAMAN R. — Media for the study of red halophilic bacteria. *Jour. Sci. Indian Res.*, ser. C, vol. 15, 1956.
142. VENKATARAMAN R. — Red halophilic bacteria. The identity of some wellknown species. *Proc. Indian Acad. Sci.*, ser. B, vol. 43, 1956.
143. WEST N. S., GILLILLAND J. R., VANGHN R. H. — Characteristics of coliform bacteria from olives. *Jour. Bact.*, vol. 41, 1941, p. 341.
144. YAMADA T., ASANO A. — Oxidation-reduction enzymes of a halophilic bacterium. *Jour. Biochem. (Japan)*, vol. 41, 1954, p. 639.
145. YAMADA T., SHIHO I. — Effect of salt concentration on the respiration of a halotolerant bacterium. *Jour. Biochem. (Japan)*, vol. 40, 1953, p. 327.
146. ZO BELL C. E. — *Marine microbiology*, ed. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass, 1946.
147. ZO BELL C. E., ANDERSON D. Q., SMITH W. — The bacteriostatic and bactericidal action of the Great Salt Lake water. *Jour. Bact.*, vol. 33, 1937, p. 253.